

柱前衍生化-HPLC 测定仲丁胺对映体的纯度

张义文, 杨 丹, 谢永美, 刘其松, 王 欣, 宋 航*

(四川大学制药与生物工程系, 成都 610065)

摘 要: 用 3, 5-二硝基苯甲酸对仲丁胺进行柱前衍生, 将其衍生物在 CHIRAL-CEL OD-H 手性固定相上拆分, 并通过二极管阵列紫外检测器对其衍生物进行检测, 建立了一种拆分仲丁胺消旋体、测定仲丁胺光学纯度的新方法。以正己烷和乙醇或异丙醇为流动相, 在 CHIRALCEL OD-H 手性固定相上对仲丁胺衍生物进行了拆分, 并考察了流动相组成和柱温对该对映体衍生物分离的影响, 获得较好的分析条件, 分离因子大于 1.2。非手性试剂柱前衍生化法测定仲丁胺光学纯度与旋光度方法比较, 结果一致。方法可用于仲丁胺对映体的质量控制。

关键词: 高效液相色谱; 柱前衍生化; 手性固定相; 仲丁胺; 光学纯度

中图分类号: O657.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0720(2009)05-072-04

仲丁胺(aminobutane, 简称 2-AB)又名 2-氨基丁烷, 是一种保护性杀菌剂, 它对多种霉菌有抗菌活性^[1]。仲丁胺是具有对映异构现象的最简单的二级胺, 它同时也是有机合成中重要的原料。其中 R-异构体具有 β -阻断、中枢神经镇痛等良好的药理和生物活性而广受关注; 该异构体还具有杀菌作用, 对蔬菜、果树、花卉的霉菌有较好的防治效果^[2]。

目前拆分仲丁胺更多是化学拆分法, 采用 D-或 L-酒石酸为拆分剂, 得到 S-(+)-仲丁胺·L-(+)酒石酸盐和 R-(-)-仲丁胺·D-(-)酒石酸盐, 从而实现分离^[3]。另外仲丁胺化学纯度检测已有文献^[3,4]报道, 而仲丁胺光学纯度测定除了传统旋光仪测定外其它方法较少。目前只有文献^[5]报道: 使用手性试剂(R)或者(S)-N-(三氟乙酰)脯氨酸酰氯对消旋仲丁胺进行衍生化反应, 生成非对映异构体在气相色谱手性毛细管柱上实现了拆分, 获得 4 个峰。本实验采用高效液相色谱分析法, 使用的衍生化试剂是非手性的, 生成的仲丁胺衍生物是对映异构体, 在色谱图中出现一对对映异构体峰, 判断简单, 测定的光学纯度峰型好, 精度高。相比

之下 HPLC 法是准确测定光学纯度有效、可靠、稳定的方法。本文研究的 HPLC 法拆分仲丁胺对映体不仅提供了一种准确测定仲丁胺光学纯度的新分析方法, 也可作为高纯度手性仲丁胺制备方法, 对手性仲丁胺相关产品研究开发以及质量控制等, 能提供基础数据和手段。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC-20AT 型高效液相色谱仪、SPD-M20A 检测器和 Class VP 色谱工作站(日本岛津公司); HCT-360 型柱温箱(天津恒奥科技发展公司); Autopol IV 型旋光仪(美国鲁道夫公司, 精度 0.001°); 超声波清洗器(上海金华仪器厂)。

色谱纯正己烷、异丙醇、无水乙醇; 98% 仲丁胺(消旋)和 98% (S)-仲丁胺(Johnson Matthey 公司, USA); 4-甲氧基苯甲酸、3,5-二硝基苯甲酸、4-氯苯甲酰氯、N,N'-二环己基碳酰亚胺(DCC)均为国药集团化学试剂有限公司; 其余试剂为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱分离条件 色谱柱: CHIRALCEL OD-H (250 mm × 4.6 mm, Daicel Chemical Industries,

* 收稿日期: 2008-03-28; 修订日期: 2008-06-10

作者简介: 张义文(1985-), 男, 硕士研究生; E-mail: hangsong@vip.sina.com

LTD 公司), 流动相均经 0.45 μm 滤膜过滤并超声脱气处理。流动相流速均为 1.5 mL/min, 检测波长 254 nm, 柱温 15~35 $^{\circ}\text{C}$ 。测定样品用流动相溶解, 进样量 2.5 μL /次, 死时间以乙酸乙酯测定。

1.2.2 样品衍生化处理 用 3,5-二硝基苯甲酸对仲丁胺衍生化^[6]: 移取 0.1 mL (0.001 mol) 仲丁胺于 30 mL CH_2Cl_2 中, 称取 0.247 g (0.0012 mol) DCC 溶于上述 CH_2Cl_2 中, 此混合物在室温下搅拌反应 5 min, 随后添加 0.212 g 3,5-二硝基苯甲酸 (0.001 mol) 进行反应, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 总反应式见图 1。在不同反应时间取样进行 HPLC 分析, 以甲苯作内标物, 分析产品与内标物峰面积之比 (AR), 发现随着反应进行产品与内标物峰面积之比逐渐增大, 但是当反应时间超过 2 h 后两者的峰面积比基本不变, 说明转化趋于稳定。将反应得到的粗品, 依次用 1 mol/L 的 HCl、1mol/L 的 NaOH、水洗涤后用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 再用旋转蒸发仪减压蒸干有机溶剂得到衍生化产物。

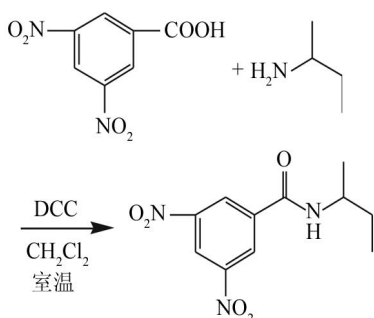


图 1 仲丁胺的衍生化反应

Fig. 1 The derivation of 2-butylamine

2 结果与讨论

2.1 二极管阵列紫外检测器对仲丁胺衍生物检测

使用外消旋仲丁胺、一定光学纯度的仲丁胺和 (S)-(+)-仲丁胺 3 种不同光学纯度的样品分别进行衍生化, 在流动相为 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醇}) = 85:15$, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下, CHIRALCEL OD-H 手性柱对仲丁胺衍生物对映体的分离情况见图 2。从图 2 可以看出, 仲丁胺消旋体衍生物出现一对对映体峰 (1, 2), 峰 2 刚好与 (S)-(+)-仲丁胺衍生物的峰重合, 而一定光学纯度的仲丁胺衍生物也在峰 1 和峰 2 的位置出峰。从而证明了峰 1, 峰 2 分别为 R 型和 S 型仲丁胺衍生物的峰。而使用正己

烷-乙醇作为流动相时, 对映体峰前出现一杂质峰, 而使用正己烷-异丙醇作为流动相时, 对映体峰后也出现一杂质峰。通过分析, 这是 DDC 在缩合反应中产生的酰基脲, 易溶于很多有机溶剂, 因其并不影响仲丁胺光学纯度的测定, 因此本实验未将其除去。

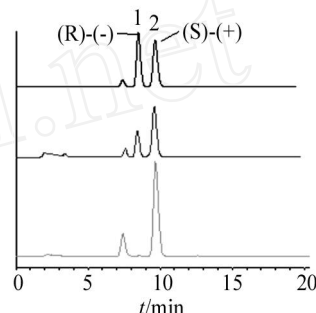


图 2 仲丁胺衍生物的 HPLC 图

Fig. 2 HPLC chromatograms of 2-Butylamine derivative

2.2 流动相组成对拆分的影响

以正己烷作为流动相分别加入异丙醇和乙醇调节极性强度, 以获得最佳峰间距和分离效果。使用 CHIRALCEL OD-H 测定不同流动相极性下仲丁胺衍生物的拆分情况, 其中柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 的结果列于表 1。流动相极性的微小变化, 对于对映体保留时间有较大的影响。乙醇做流动相极性调节剂时, 分离度比异丙醇高, 并且峰型较好, 出峰时间也较异丙醇短, 符合快速分析的要求。而异丙醇作为调节剂时, 对映体峰有的未与杂质分开。实验表明, 当 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醇}) = 80:20$ 时, 两个峰既实现了基线分离, 杂质峰又离对映体峰较远, 出峰时间较短, 分离因子也较大, 这是最适合分析使用的条件 (图 3)。

2.3 温度对分离的影响

流动相为 $V(\text{正己烷}):V(\text{乙醇}) = 80:20$ 时, 测定不同温度下仲丁胺衍生物在 CHIRALCEL OD-H 拆分情况, 发现随着柱温的升高分离因子逐渐下降, 并且分离因子与温度几乎成线性关系。因为随着温度的降低导致平衡常数增大, 对映体分离因子 α 增大。但是温度低时, 保留时间较长, 不适合于分析。所以, 温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 是适合于分析所使用的条件。

表 1 流动相组成对分离效果的影响

Tab. 1 The influence of the composition of mobile phase on the separation effect

流动相的组成	保留时间/min		分离因子 α	分离效果
	t_R (S)	t_R (R)		
V(正己烷) :V(乙醇) = 70 :30	4.192	4.608	1.26	基本达基线分离
V(正己烷) :V(乙醇) = 72 :28	4.405	4.864	1.253	基本达基线分离
V(正己烷) :V(乙醇) = 75 :25	4.779	5.312	1.243	达基线分离
V(正己烷) :V(乙醇) = 80 :20	5.845	6.603	1.233	达基线分离
V(正己烷) :V(乙醇) = 83 :17	6.805	7.723	1.218	达基线分离
V(正己烷) :V(乙醇) = 85 :15	7.851	8.981	1.215	达基线分离
V(正己烷) :V(乙醇) = 90 :10	11.872	13.76	1.203	达基线分离
V(正己烷) :V(异丙醇) = 78 :22	10.112	12.075	1.261	未与杂质分开
V(正己烷) :V(异丙醇) = 80 :20	11.733	13.643	1.209	基本达基线分离
V(正己烷) :V(异丙醇) = 82 :18	13.973	16.853	1.253	未与杂质分开
V(正己烷) :V(异丙醇) = 85 :15	18.197	21.227	1.194	达基线分离
V(正己烷) :V(异丙醇) = 90 :10	28.491	37.433	1.345	达基线分离

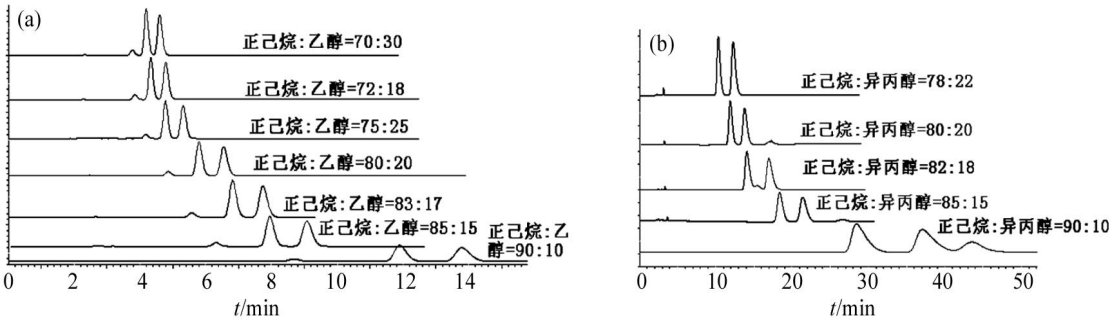


图 3 乙醇(a)和异丙醇(b)作调节剂仲丁胺衍生物色谱图

Fig. 3 Chromatograms using ethanol (a) and isopropanol (b) as regulator

2.4 线性范围、检出限和精密度

仲丁胺衍生物质量浓度在 391~1000 μg/L 范围内,标准曲线有良好的线性,标准曲线为 $y = 152637\rho + 1393$ (y 为仲丁胺衍生物峰面积,单位为 mAU; ρ 为仲丁胺衍生物的质量浓度,单位为 10^{-1} μg/L),相关系数为 0.9994 ($n = 9$)。稀释至色谱峰信噪比接近 3 时,得到仲丁胺衍生物检出限为 391 μg/L。连续 11 次重复测定,相对标准偏差(RSD)在 1.3 %内。

2.5 测定 e. e. 值的两种方法比较

用 S-仲丁胺和外消旋仲丁胺配制 3 种不同光学纯度仲丁胺,测量其旋光度,通过公式(1)计算出仲丁胺的光学纯度。再将这 3 种不同光学纯度

的仲丁胺进行衍生化,得到的产品分别进行 HPLC 分析,按照公式(2)计算出仲丁胺衍生物的光学纯度。

光学纯度 = $\frac{\text{比旋光度测量值}}{\text{比旋光度标准值}} \times 100\%$ (1)

光学纯度 e. e. % = $\frac{AR - AS}{AR + AS} \times 100\%$ (2)

如表 2 所示,两种方法测量的光学纯度偏差最大不超过 1 %,在仪器测定偏差内。说明仲丁胺在衍生化过程中没有发生消旋化,3, 5-二硝基苯甲酸衍生仲丁胺测其光学纯度方法可行。与旋光仪测定相比,HPLC 法排除了带旋光杂质对光学纯度测定的影响,更加准确、稳定。

表 2 旋光仪与 HPLC 方法测定的仲丁胺光学纯度比较

Tab. 2 The comparison of optical purity of 2-butylamine by polarimeter and HPLC

样品标号	旋光仪法测定的光学纯度 [*] / %	HPLC 法测定的光学纯度 / %	偏差 ^{**} / %
1	0.006	0.44	0.434
2	50.12	50.56	0.44
3	98.54	99.02	0.48

* 按标准值为 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +7.4^{471}$ ($c = 4.7$, H_2O) 换算得到光学纯度。

** HPLC 法值-旋光度法值

参考文献

- [1] 何晓哈, 纪淑娟等. 食品研究与开发, 2004, 25(4): 144
- [2] 车超, 代星, 毛淑芬等. 有机化学, 2003, 23(4): 390
- [3] 崔同, 乞永艳等. 中国食品添加剂, 1997, (1): 8
- [4] 崔同, 傅承光等. 分析测试学报, 1995, 14(5): 53
- [5] David A Durden, Bruce A Davis, Alan A Boulton. J Chromatogr B, 1997, (689): 165
- [6] 徐旭, 宋航, 孙娟等. 分析试验室, 2007, 26(4): 89
- [7] Thom L G. Ber, 1903, 36: 582

Determination of enantiomeric purity for 2-butylamine by HPLC combining with pre-column derivatization

ZHANG Yi-wen, YANG Dan, XIE Yong-mei, LIU Qi-song, WANG Xin and SONG Hang^{*} (Department of Pharmaceutical and Biological Engineering, Sichuan University, Chengdu 610065), Fenxi Shiyanshi, 2009, 28(5): 72~75

Abstract: 2-Butylamine was derivatized with 3,5-dinitrobenzoic acid that was the reagent of pre-column derivatization of high performance liquid chromatography. The derivative was separated by CHIRALCEL OD-H chiral stationary phase, and detected by a Photo-Diode-Array detector. A method for separating the racemate and determining the enantiomeric purity of 2-butylamine was established. Chromatographic model was employed for enantiomeric separation of 2-butylamine derivatives on the CHIRALCEL OD-H chiral column in hexane/alcohol (ethanol or isopropyl alcohol) mobile phase. The effects of chromatographic conditions, such as mobile phase and temperature on chiral recognition, had been investigated. A better condition of analysis was obtained and the separation factor was more than 1.2. Furthermore, the results of enantiomeric purity determined by both polarimeter and HPLC were very consistent. The presented study provided a simple and reproducible method for the enantiomeric quality control of 2-Butylamine.

Keywords: High performance liquid chromatography; Pre-column derivatization; Chiral stationary phase; 2-Butylamine; Optical purity